

学校编码: 10384
学号: 21720081152566

分类号__密级__
UDC__

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

BRCA 基因的克隆, 表达与纯化

BRCA Gene Cloning, Protein Expression and Purification

李 振

指导教师姓名: 李晓彤 教授

专 业 名 称: 发育生物学

论文提交日期: 2011 年 4 月

论文答辩时间: 2011 年 6 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: __

评 阅 人: __

2011 年 6 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	II
1 前言.....	1
1.1 BRCA 基因定位.....	1
1.2 BRCA 蛋白的结构.....	2
1.3 BRCA 蛋白功能.....	4
1.4 BRCA 突变与乳腺癌.....	10
1.5 BRCA 与乳腺癌预后.....	12
1.6 本课题研究的目的是和意义.....	14
2 材料与方法.....	16
2.1 常用的药品试剂和主要仪器.....	16
2.2 DNA 相关实验方法.....	17
2.3 细胞培养及转染.....	27
2.4 蛋白质相关实验方法.....	28
2.5 动物免疫实验和抗血清效价测定.....	31
3 实验结果.....	34
3.1 MCF-7 total RNA 提取.....	34
3.2 BRCA 基因 PCR 扩增.....	34
3.3 GST-tag 原核表达质粒的构建.....	35
3.4 BRCA 测序结果.....	36
3.5 His-tag 原核表达质粒的构建.....	39
3.6 BRCA 融合蛋白诱导表达及纯化.....	40
3.7 免疫小鼠抗血清的效价检测.....	45
3.8 真核表达载体的构建及检测.....	46
4 讨论.....	49
参考文献.....	51
致谢.....	57

Contents	
Abstract in Chinese	I
Abstract in English	II
1 Introduction	1
1.1 The localization of BRCA genes.....	1
1.2 The structure of BRCA proteins.....	2
1.3 The function of BRCA proteins.....	4
1.4 The BRCA mutations linked to breast cancer.....	10
1.5 BRCA linked to the prognostic of breast cancer.....	12
1.6 The goal of this project.....	14
2 Materials and Methods	16
2.1 Reagents and instruments.....	16
2.2 Experiments and methods for DNA.....	17
2.3 Cell culture and DNA transfection.....	27
2.4 Experiments and methods for protein.....	28
2.5 Animal immunization and antiserum titer test.....	31
3 Results	34
3.1 Isolation of total RNA from MCF-7.....	34
3.2 PCR amplification of BRCA.....	34
3.3 Construction of GST bacterial expression vectors.....	35
3.4 Sequencing result of BRCA.....	36
3.5 Construction of His bacterial expression vectors.....	39
3.6 Expression and Purification of BRCA fusion proteins.....	40
3.7 Antiserum titer test.....	45
3.8 Construction of mammalian expression vectors.....	46
4 Discussion	49
References	51
Acknowledgement	57

摘要

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤之一，全世界每年确诊患有乳腺癌疾病的妇女就高达 100 多万人。乳腺癌根据遗传与否，可分为散发性乳腺癌和家族遗传性乳腺癌。通过对大量乳腺癌病例进行研究分析，发现遗传性乳腺癌患者占乳腺癌患者的 5%-10%。对高危遗传性乳腺癌家庭的进一步深入研究，发现了两种乳腺癌易感基因 BRCA1 和 BRCA2。虽然现在普遍认为 BRCA1 和 BRCA2 属于抑癌基因，与同源重组、DNA 损伤修复和转录调控等有关，但其具体作用机制仍不是很清楚，有待进一步研究。

众所周知，特异性良好的抗体是研究蛋白质表达水平与功能的基础。为了得到对 BRCA 基因进行更深一步研究所需的抗体，我们进行了如下基础工作，首先分别克隆了 BRCA1 基因和 BRCA2 基因的一个片段，构建其原核表达载体，后将构建好的原核表达载体转化大肠杆菌并诱导表达，获得了融合蛋白，并对融合蛋白进行亲和纯化。将纯化后的融合蛋白作为抗原免疫 BALB/c 小鼠。免疫完成后应用 ELISA 方法检测抗血清效价。随后又构建了真核表达载体转染 293T 细胞，利用我们所获得的鼠抗血清检测转染 293T 细胞后的 BRCA 基因的外源过表达。经过 ELISA 和 Western Blot 检测，证实免疫后的 BALB/c 小鼠血清能够检测我们所克隆和表达的 BRCA 基因。

本文的主要意义在于为 BRCA 基因的深入研究做了前期的准备工作。

关键词：乳腺癌易感基因；分子克隆；抗体

Abstract

Breast cancer is one of the most common malignant tumors among women around the world. It was estimated that every year, over one million women were diagnosed with breast cancer world wide. Based on hereditary, breast cancer can be divided into two groups, sporadic breast cancer and family hereditary breast cancer. By analyzing a large number of breast cancer cases, researchers found that patients with hereditary breast cancer accounts for 5%-10% of breast cancer patients. Two types of breast cancer susceptible genes, BRCA1 and BRCA2, were found by further studies with the high-risk hereditary breast cancer families. Although BRCA1 and BRCA2 were recognized as tumor-suppressors with functions involving in homologous recombination, DNA damage repair and transcription regulation, it is still unclear that how they regulate these cellular activities , which needs further study.

It is well known that the specific antibody is required to study a gene expression and regulation. In order to obtain BRCA antibodies, we cloned the fragments of BRCA1 gene and BRCA2 gene first and then constructd the bacterial expression vectors. The constructed expression vectors were transformed into E. coli and induced to express, fusion proteins were successfully obtained and purified. We immunized BALB/c mice with purified fusion proteins and tested antiserum titre by ELISA method. In addition, we constructed eukaryotic expression vectors and transfected them into 293T cells to test over-expression of BRCA gene by mice antiserum. By applying Western Blot and ELISA methods, we confirmed that the antiserum could detect over-expressed BRCA proteins in cells.

The significance of this work is to lay the foundation for future BRCA studies.

Keywords: BRCA;molecular cloning;antibody

1 前言

1.1 BRCA 基因定位

1.1.1 BRCA1 基因定位

BRCA1 (breast cancer susceptibility gene 1) 基因是第一个发现的家族性乳腺癌易感基因。Haageesen^[1]等 1956 年对 403 例乳腺癌病人的家族史进行调查分析,发现 86 例病人有乳腺癌家族史,并且通过进一步分析发现如果亲代女性患乳腺癌则其后代女性在 40 岁之前患乳腺癌的危险性是无家族史的 40-50 倍,进而推断乳腺癌具有家族遗传倾向。而后又通过大量的实验研究确认了乳腺癌的遗传倾向性^[2]。一些西方科学家通过对乳腺癌流行病学的调查研究进一步确认了乳腺癌家族遗传性是乳腺癌发病的高危因素。

1974 年 King 等通过对大量流行病学研究发现乳腺癌与遗传因子有关,患者常染色体上有显性基因突变,并能从父母遗传给子代。1980 年对 11 个乳腺癌高危家族进行分离和连锁分析,发现有增加乳腺癌易感趋势的等位基因和谷氨酸-丙氨酸转氨酶连接在一起^[3]。1990 年 Hall^[4]等通过对 23 个乳腺癌家族进行基因连锁分析,发现约 40%家族与 17q21 染色体上的一个标记物 D17S74 连锁且患者的平均确诊年龄在 46 岁以下,早发性家族乳腺癌与 17q21 上的基因突变有一定的联系。1991 年 Narod^[5]等通过调查 5 个大的遗传性乳腺癌/卵巢癌家族,验证了 Hall 等的论断,认为该基因也是遗传性卵巢癌的易感基因并将该基因命名为 BRCA1。1994 年 Miki^[6]等用定点克隆技术首次成功获得该基因的全长序列,并定位在 17q21 区的中间大约 100kb 区域内,位于两个遗传标记物 D17S1321 和 D17S1325 之间,并跨越 D17S855。

1.1.2 BRCA2 基因定位

BRCA2 基因是继 BRCA1 基因发现后,通过对家族性乳腺癌进一步研究得到的一个新的乳腺癌易感基因。BRCA1 可以解释早发性乳腺癌伴卵巢癌家族和 45%乳腺癌家族,但很难解释男女性乳腺癌均发的家族。虽然 AT (Ataxia Telangiectasia: AT) 突变和 p53 胚系突变与乳腺癌发病有一定的联系,但也只能解释一小部分与 BRCA1 无关乳腺癌家族。这促使了对乳腺癌相关基因的进一步研究。

Wooster^[7]等对 15 个患有多例早发性乳腺癌而又与 BRCA1 无关的家族进行基因组连锁分型分析, 发现一个新的与早发性乳腺癌相关联的基因 BRCA2, 并将其定位于 13q12-13 这个区域。多点 Lot 计分法分析显示早发性乳腺癌家族与 D13S260 和 D13S267 最大连锁率达 9.58%。两个重组人工染色体定位 BRCA2 于 D13S289; 一个来源于双侧乳腺癌的重组人工染色体定位 BRCA2 的着丝点于 D13S267。至此确定 BRCA2 位于 13q12-13 上标记物 D13S289/90 和 D13S267 之间的区域, 其后又被定位于 D13S171 为中心大约 716kb 的范围内^[8]。

1.2 BRCA 蛋白的结构

1.2.1 BRCA1 蛋白结构

BRCA1 蛋白由 1863 个氨基酸组成, 分子质量为 180KD-220KD。它有若干个重要的与其它蛋白质相互作用的功能结构域。N 端是一个富含半胱氨酸和组氨酸的高度保守的锌指结构域, 具有典型的 Cys3-His-Cys4 的环指结构^[9,10,11]。200aa-300aa 之间是核定位区, 负责编码 2 个核定位信号 NLS1 和 NLS2^[12,13]。452aa-1079aa 这一区域是 DNA 结合结构域, 主要与 DNA 修复有关^[14]。BRCA1 中间区域 1280aa-1524aa 是丝氨酸和苏氨酸富集的 SCD 结构域, 它可与 ATM、MDC1、NBS1 等结合而且能够被磷酸化修饰^[15]。C 端有两个串联的 BRCT 结构域, 其中一个位于 1642aa-1736aa, 另一个位于 1756aa-1855aa^[16]。它是结合磷酸化蛋白质的一个模序, 在很多跟 DNA 修复通路有关的蛋白中都能找到这个结构域^[17,18]。且 C 端富含酸性氨基酸, 由此推断该区具有转录激活作用。

RNA 聚合酶 II, p300, BACH1, 组蛋白去乙酰化酶 1 和 2, CtIP 和 RB 等可以结合到 BRCT 结构域^[19,20]。MRE11, RAD50, NBS1, MDC1, ATM, CHK2 和 CDK2 等都可以结合到 SCD 结构域。BRCA1 蛋白的 DNA 结合结构域主要跟 DNA 损伤修复有关, 它是通过相应蛋白的调节作用实现的^[19,21]。BRCA2, RAD51 可以跟 BRCA1 结合。PALB2 是 BRCA2 结合到 DNA 损伤处的募集因子^[22]。RAD51 是一个可结合到单链 DNA 上的重组酶, 可与 BRCA2 相互作用而结合到单链 DNA 参与重组修复。SW1 和 SNF 可与 BRCA1 在 260aa-553aa 结合。NLS 可与 p53, MYC, RB 和 ZBRK1 结合。N 端锌指结构域和 BRCT 结构域序列高度保守, 这两个结构域对 BRCA1 的完整功能是必不可少的^[23]。BRCA1 E3 具有

泛素化连接酶的活性且能够通过与 BARD1 的结合增强其泛素化连接功能。上述蛋白的相互作用与细胞各种生命活动进程有关，如 DNA 损伤修复，细胞周期调控，转录活化与抑制，细胞凋亡和泛素化等。这些过程赋予了 BRCA1 肿瘤抑制活性^[22,24]。

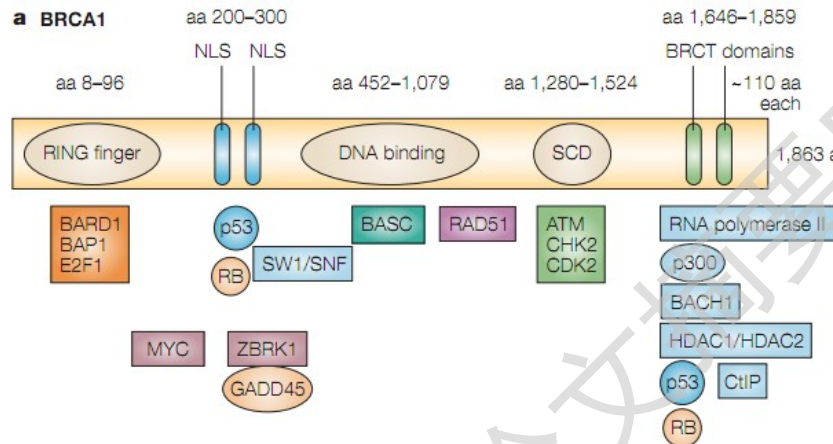


图 1.1 BRCA1 蛋白的功能结构域及其相互作用蛋白

Fig. 1.1 Functional domains of BRCA1 and selected binding partners

图片来源：S.A. Narod, W.D. Foulkes, BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond, Nature Reviews Cancer 4 (2004) 665-676.

1.2.2 BRCA2 蛋白结构

BRCA2 全基因组 DNA 长约 70kb，编码区含有 10987bp，富含 AT(约 64%)，共有 27 个外显子，其中第 11 个外显子特别大，长约 4932bp。mRNA 长约 10kb，编码的 BRCA2 蛋白由 3418 个氨基酸残基组成。

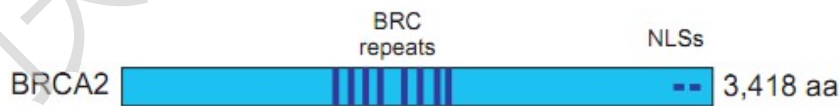


图 1.2 BRCA2 蛋白的结构特征

Fig. 1.2 Features of the BRCA2 proteins

图片来源：A.R. Venkitaraman, Functions of BRCA1 and BRCA2 in the biological response to DNA damage, Journal of Cell Science 114 (2001) 3591-3598.

BRCA2 是机体保护性生物大分子蛋白质，与其他已知功能蛋白无明显序列同源性。BRCA2 蛋白的结构主要分为三部分：N 端、中间部分和 C 末端。目前 N 端还没有发现功能结构域。中间部分分布着 8 个由 30-80 个氨基酸残基组成的 BRC 结构模体^[20]（见图 1.2）。哺乳动物和鸟类的 BRC 结构模体的序列非常保守

^[25]，它是 BRCA2 蛋白与 RAD51 相结合的位点^[26]。RAD51 蛋白是酵母 ScRad51 蛋白和细菌 RecA 蛋白的同源蛋白质，它参与 DNA 损伤修复及基因重组，与 BRCA2 蛋白一起共同定位于双链 DNA 断裂的位点。C 末端含有 5 个与 DNA 结合模体相类似的结构域 BRCA2 DBD (DNA/DSS1-binding domain) 即螺域、OB1、OB2、OB3、塔域^[27]。其中 OB3、OB2、OB1 和螺域成线性排列，塔域则从核心结构向外突出。螺域的核心结构由 4 个螺旋束 ($\alpha 1$ 、 $\alpha 8$ 、 $\alpha 9$ 、 $\alpha 10$) 和 2 个连续的 β 发夹结构 ($\beta 1$ 、 $\beta 4$) 组成。OB 折叠体由 5 条高度卷曲的 β 折叠链 ($\beta 1$ 至 $\beta 5$) 形成一个 β 桶装结构。塔结构域主要由两条反向平行的无卷曲的 α 螺旋 ($T\alpha 1$ 、 $T\alpha 5$) 构成。C 端还有一个 NLS (nuclear location signal)，起到帮助 RAD 转运到细胞核并定位于 DNA 损伤位点的作用^[28]。

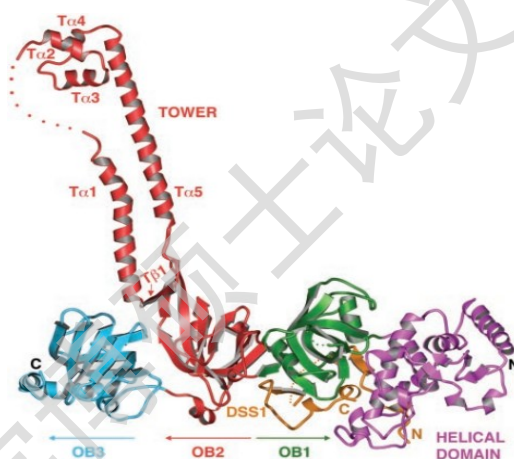


图 1.3 鼠 BRCA2DBD-DSS1 结构示意图

Fig. 1.3 Over view of the mouse BRCA2 DBD-DSS1 structure

图片来源: H. Yang, P.D. Jeffrey, J. Miller, E. Kinnucan, Y. Sun, N.H. Thom, N. Zheng, P.L. Chen, W.H. Lee, N.P. Pavletich, BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure, Science 297 (2002) 1837.

1.3 BRCA 蛋白功能

1.3.1 BRCA1 蛋白功能

1.3.1.1 BRCA1 蛋白与 DNA 损伤修复

BRCA1 蛋白参与 DNA 损伤修复，在维持基因组的完整性方面起重要作用。基因损伤中最危险是 DNA 双链损伤(DNA Double-Strand Beraks, DSBs)。放射线照射、一些化疗药物、DNA 复制叉介入到一个单链损伤或其他类型的损伤、内

源性的活性氧和染色体的机械压力都能造成 DSBs。研究证实 DSBs 与基因突变、染色体异常和细胞恶性化转型相关。DSBs 的修复比较复杂，因此认为这个过程具有重要的生物学特性^[29]。BRCA1 功能的缺失引起了 DSBs 修复的异常将导致肿瘤的发生。当细胞中 BRCA1 功能缺失时，细胞对 DNA 交联药物和致双链损伤的顺铂和丝裂霉素 C 相当敏感^[30,31]。上述细胞中 DNA 双链损伤一般由 NHEJ(非同源重组末端连接)修复，但是很容易导致染色体的重排，而染色体不稳定性又是癌变过程的一个重要特征^[32]。DNA 损伤时，BRCA1 和 RAD51 首先定位到损伤区域，在这过程中 BRCA1 被磷酸化，RAD51 和 BRCA2 的 BRC 重复序直接相互作用，使其处于未激活状态，当 BRCA2 缺失时，RAD51 foci 不能形成^[26,33]。BRCA1，BRCA2 和 RAD51 在 DNA 复制时或后期发生作用，它们通过共同的途径来保证基因组的完整性和染色体的稳定性^[14]。

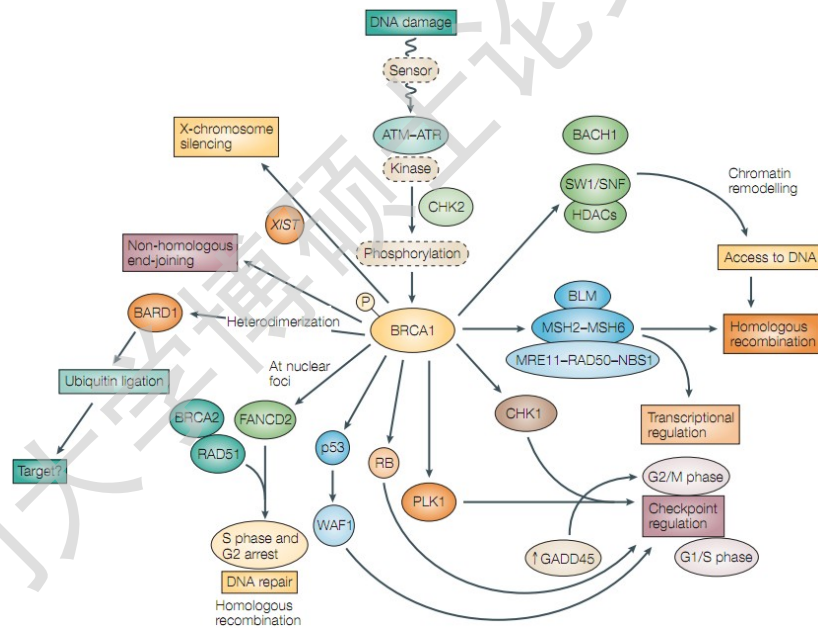


图 1.4 BRCA1 蛋白的主要生物学功能途径

Fig. 1.4 Biological pathways of BRCA1

图片来源：S.A. Narod, W.D. Foulkes, BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond, Nature Reviews Cancer 4 (2004) 665-676.

1.3.1.2 BRCA1 与细胞周期调控

BRCA1 的一个重要功能是对细胞周期检控点的控制。BRCA1 蛋白可以与细胞周期素 A、D 和细胞周期依赖性激酶结合并随细胞周期呈现磷酸化和去磷酸化

状态的变化。G1 晚期和 S 期呈现高度磷酸化状态，M 期后转为去磷酸化状态^[34]。在 G1-S 期检控点，DNA 损伤经常会导致复制叉的停滞或破坏，为了减少由此造成的 DSBs 的危害，BRCA1 通过与转录因子 E2F1 和细胞周期蛋白相互作用，抑制细胞的增殖和分裂，还可通过 p53 和 WAF1 使细胞停滞于 S 期^[35,36]。BRCA1 是通过调节 CHK1 的磷酸化状态参与 G2-M 检控点的调节的^[34,37]。虽然现在还不清楚 BRCA1 定位到 DSB 是怎样促使 CHK1 实现磷酸化的，一个可能是 BRCA1 通过使 DSB 处的底物泛素化增强 ATM 信号转导来修饰染色质的结构，另一种可能情况是 BRCA1 在 DSB 处作为一个骨架蛋白来间接增强 CHK1 的磷酸化^[38]。

BRCA1 蛋白具有和许多 DNA 结合蛋白结构类似的锌指结构域和酸性氨基酸区域，说明其可能为一种转录因子。BRCA1 蛋白能刺激 p21 和 MDM2 的表达以及体外实验证实 BRCA1 蛋白 C 端的酸性区域与酵母 Gal4 基因 DNA 结合位点结合后，可充当转录起始因子这些都为其是一种转录因子提供直接证据^[39]。一般认为 BRCA1 蛋白通过锌指结构域与一些细胞周期调控蛋白相互作用发挥对细胞周期的负调控。

1.3.1.3 BRCA1 与泛素化

泛素化是使蛋白加上泛素标签从而使其发生蛋白酶体降解的过程。许多有泛素化功能的蛋白都具有环指结构域（Ring-Finger Motif），BRCA1 和与其相互作用的蛋白 BARD1 在 N 端都有这样的一个结构域，它们的复合物在泛素化过程中发挥重要作用^[40]。BRCA1 介导的泛素化和 DNA 损伤修复也有一定的联系^[41]。

1.3.1.4 BRCA1 与中心体复制

中心体复制是在精确的调控下进行的，这一过程失调将引起染色体的不对称分离，非整倍体增加最终导致肿瘤的形成。Hsu^[42]等发现 BRCA1 与中心体的重要成分 γ -微球蛋白（负责微管及有丝分裂纺锤体的形成）之间存在相互作用。BRCA1 突变的鼠胚胎成纤维细胞（MEFs）中有 25% 的细胞具有两个或两个以上中心体，在有丝分裂中引起染色体的不对称分离及微核的形成，这证明了 BRCA1 在调节中心粒复制过程起着重要的作用。

1.3.2 BRCA2 蛋白功能

1.3.2.1 BRCA2 蛋白与 DNA 损伤修复

BRCA2 在同源重组修复过程中起到什么样的作用，至今仍不是很明确。有报道指出 BRCA2 可以调节 RAD51，通过形成复合体的形式共同定位到 DNA 损伤部位，促使同源核苷酸相互配对从而达到同源重组修复的目的^[43]。

目前有一种假说认为：BRCA2-RAD51 复合物在机体内存在着两种不同的形式即活性形式和非活性形式。非活性状态时，复合物通过 RAD51 蛋白因子阻止单链 DNA 的混杂结合；活性状态时，RAD51 能形成核蛋白细丝并通过 BRCA2 蛋白将其运送到 DNA 损伤位点。DNA 损伤激活激酶（ATM、ATR）催化 BRCA2-RAD51 蛋白复合物磷酸化，使其活化。其具体过程大致为：当双链 DNA 受到损伤时，发出 DNA 损伤信号，进一步激活如 ATM、ATR 等激酶的酶活性，以催化 BRCA2-RAD51 蛋白复合物发生磷酸化，使其由无活性形式转化为活性形式，然后，BRCA2 蛋白携带 RAD51 蛋白共同转运至双链 DNA 损伤位点，参与双链 DNA 损伤的重组修复。不过，该假说有很多地方仍存在着缺陷，需不断完善，如活化的 RAD51 蛋白是否将从 BRCA2-RAD51 蛋白复合物中脱落下来等^[28]。

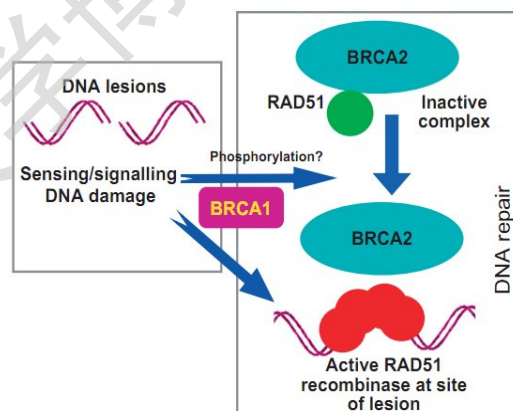


图 1.5 BRCA2 的双链 DNA 断裂修复模型

Fig 1.5 A model for the role of BRCA2 in DSB repair

图片来源：A.R. Venkitaraman, Functions of BRCA1 and BRCA2 in the biological response to DNA damage, Journal of Cell Science 114 (2001) 3591-3598.

1.3.2.2 BRCA2 与细胞表达调控

BRCA2 在 G₀、G₁ 期和 M 期为低表达，S 期和 G₂ 期达到高峰，S 期进入

S/M 期保持相对较高水平的表达呈现出明显的细胞周期依赖性。BRCA2 在小鼠胚胎发育及乳腺上皮细胞的增殖分化过程中都存在高表达,这说明其在细胞生长调节过程中起着非常重要的作用。

BRCA1 启动子有甲基化现象,并能抑制 BRCA1 自身的表达,但在 BRCA2 启动子中并未发现有甲基化的现象^[44]。现在已发现一些转录因子包括 USF、NF- κ B、Elf、SLUG 等可以结合到 BRCA2 的启动子上参与 BRCA2 表达的调节。SLUG^[45]与-701~-921 区域的 E2-box 结合(两侧有 Alu 序列),下调 BRCA2 的表达。USF 与 E-box 结合^[46], p53 可通过抑制 USF 与 BRCA2 启动子结合,抑制 BRCA2 的表达^[47], Elf 作为 Est 家族的一个成员,Est 与识别基序结合^[46], NF- κ B 结合于 BRCA2 启动子的-144~-59 区域的 NF- κ B 结合位点^[48], USF、Elf1、NF- κ B 均上调 BRCA2 的表达。

在分离与 BRCA2 相互作用的 DNA 序列的过程中, Hughes Davies L^[49]等发现一种新的蛋白 EMSY,它通过与 BRCA2 转录调控区相结合,抑制 BRCA2 的反式激活活性,进而影响到 BRCA2 基因的表达,它也能够与 BRCA2 的 3 号外显子结合,并通过 BRCA2-GAL4 融合蛋白抑制报告子结构的激活。Afshin Raouf^[50]等将 EMSY 基因导入乳腺癌细胞系中使之过表达,模拟缺失 BRCA2 活性,结果发现实验组比对照组产生更多的染色体断裂,由此推断 EMSY 基因的过表达可能导致 BRCA2 活性受到抑制,从而诱发恶性肿瘤细胞群的形成。散发性乳腺癌患者的 EMSY 表达量会增加,且 EMSY 有关闭 BRCA2 基因表达的功能,这可能成为散发性乳腺癌的遗传线索。所以 EMSY 不仅能抑制 BRCA2 介导的转录激活,还能影响 BRCA2 对损伤 DNA 的修复能力即 EMSY 可能具有对抗 BRCA2 的功能。

1.3.2.3 BRCA2 与基因组稳定

研究发现,在人类的一些 BRCA2 基因缺陷性疾病中,染色体断裂紊乱^[51]、染色体结构缺陷及基因组不稳定的几率大大增加^[52],并且都存在一定程度的 DNA 修复能力缺陷和对 DNA 损伤的敏感,证实 BRCA2 具有维持基因组稳定的 caretaker 的作用^[53,54]。

研究发现有丝分裂检验点功能丧失与 BRCA2 突变有着一定的联系,

BRCA2^{-/-}小鼠肿瘤细胞中与有丝分裂检验点相关的基因如 Mad3L、p53 等（这些检测点基因检测着丝粒的活性，以监控染色体与纺锤体的正确排列）通常会发生突变，并伴有纺锤体组装检验点功能的丧失。在染色体凝聚时 BRCA2 蛋白和 BRAF35 染色质复合物之间会发生相互作用，共同参与 DNA 的损伤修复及维持细胞周期的正常进行^[55]。Matthew J Daniels^[56]等证实双核细胞增多与 BRCA2 的缺失有一定的联系。通过 RNA 干扰等遗传学方法抑制 BRCA2 的活性，会导致细胞分裂的延迟或停止，同时也会作用于细胞分裂相关蛋白 myosin II，使相关组织表现异常。将 BRCA2 抗体微量注射进 HeLa S3 细胞浆，会引起细胞双核和中心粒扩增现象的发生^[57]。

1.3.2.4 BRCA2 与细胞增殖

BRCA2 蛋白抑制肿瘤形成的机制是否与调控细胞增殖有关，至今尚不清楚，但有报道指出它可以抑制体内肿瘤生长和体外细胞增殖^[58]。

肿瘤细胞生长速度与 BRCA2 表达水平有一定联系。有报道指出通过转染的方法使 Capan-1 细胞系外源性表达野生型 BRCA2 蛋白，进而得到了两个克隆 CINBRCA2 和 236BRCA2，通过观察检测细胞生长速度和繁殖情况，发现与亲本 Capan-1 细胞以及空转载体质粒的对照组 Capan-1 细胞相比上述两个克隆的生长速度和细胞增殖都相对较慢，这说明野生型的 BRCA2 表达能抑制肿瘤细胞的生长，抑制水平与表达水平有关。

通过研究 Capan-1 细胞系的 p53 突变，发现 BRCA2 抑制细胞增长的机制独立于 p53 途径之外。进一步研究发现由于在 Capan-1 细胞系中 Rb 细胞周期调控途径是失活的，所以 BRCA2 的抑制功能也不是通过 Rb 途径实现的。做细胞流式分析也没有发现细胞周期分布的异常。故据此推断转染 BRCA2 质粒得到的两个克隆 CINBRCA2 和 236BRCA2 生长速率的下降不可能源于细胞凋亡或细胞周期的阻滞。

将亲本肿瘤细胞和转染 BRCA2 质粒的肿瘤细胞分别接种裸鼠，实验证实接种了亲本肿瘤细胞不表达野生型 BRCA2 实验组肿瘤快速增长，但两个表达野生型 BRCA2 实验组没有肿瘤长出，这说明不表达野生型 BRCA2 蛋白对肿瘤生长可能是必需的。上述一系列研究证实野生型 BRCA2 的表达不仅能在体外抑制

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库